

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

06.12.2004



REC'D 14 DEC 2004

WIPO PCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 103 44 410.6

Anmeldetag: 25. September 2003

Anmelder/Inhaber: Leica Microsystems Heidelberg GmbH,
68165 Mannheim/DE

Bezeichnung: Rastermikroskop mit evaneszenter Beleuchtung

IPC: G 02 B 21/00

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 18. November 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
 Im Auftrag

Stanschus

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Rastermikroskop mit evaneszenter Beleuchtung

Die Erfindung betrifft ein Rastermikroskop.

In der Rastermikroskopie wird eine Probe mit einem Lichtstrahl beleuchtet, um
5 das von der Probe emittierte Detektionslicht, als Reflexions- oder Fluoreszenzlicht, zu beobachten. Der Fokus eines Beleuchtungslichtstrahlenbündels wird mit Hilfe einer steuerbaren Strahlablenkeinrichtung, im Allgemeinen durch Verkippen zweier Spiegel, in einer Probenebene bewegt, wobei die Ablenkachsen meist senkrecht aufeinander stehen, so dass ein Spiegel in x-; der andere in y-Richtung ablenkt. Die Verkippung der Spiegel wird beispielsweise mit Hilfe von Galvanometer-Stellelementen bewerkstelligt. Die Leistung des vom Objekt kommenden Detektionslichtes wird in Abhängigkeit von der Position des Abtaststrahles gemessen. Üblicherweise werden die Stellelemente mit
10 Sensoren zur Ermittlung der aktuellen Spiegelstellung ausgerüstet. Speziell in der konfokalen Rastermikroskopie wird ein Objekt mit dem Fokus eines Lichtstrahls in drei Dimensionen abgetastet.
15 Ein konfokales Rastermikroskop umfasst im Allgemeinen eine Lichtquelle, eine Fokussieroptik, mit der das Licht der Quelle auf eine Lochblende – die sog. Anregungsblende – fokussiert wird, einen Strahlteiler, eine
20

Strahlablenkeinrichtung zur Strahlsteuerung, eine Mikroskopoptik, eine Detektionsblende und die Detektoren zum Nachweis des Detektions- bzw. Fluoreszenzlichtes. Das Beleuchtungslicht wird über einen Strahlteiler eingekoppelt. Das vom Objekt kommende Fluoreszenz- oder Reflexionslicht

5 gelangt über die Strahlablenkeinrichtung zurück zum Strahlteiler, passiert diesen, um anschließend auf die Detektionsblende fokussiert zu werden, hinter der sich die Detektoren befinden. Diese Detektionsanordnung wird Descan-Anordnung genannt. Detektionslicht, das nicht direkt aus der Fokusregion stammt, nimmt einen anderen Lichtweg und passiert die

10 Detektionsblende nicht, so dass man eine Punktinformation erhält, die durch sequentielles Abtasten des Objekts mit dem Fokus des Beleuchtungslichtstrahlenbündels zu einem dreidimensionalen Bild führt. Meist wird ein dreidimensionales Bild durch schichtweise Bilddatennahme erzielt.

15 Aus US 2002/0097489 A1 ist ein Mikroskop mit evaneszenter Beleuchtung einer Probe bekannt. Das Mikroskop beinhaltet eine Weißlichtquelle, deren Licht über eine Schlitzblende durch das Mikroskopobjektiv hindurch in den eine Probe tragenden Objektträger zur evaneszenten Beleuchtung eingekoppelt wird. Das Beleuchtungslicht pflanzt sich in dem Objektträger

20 durch totalinterne Reflexion fort, wobei die Beleuchtung der Probe nur im Bereich des aus dem Objektträger herausragenden evaneszenten Feldes erfolgt. Mikroskope dieser Art sind unter dem Begriff TIRFM (Total Internal Reflection Fluorescent Microscope) bekannt.

Die z-Auflösung von TIRF-Mikroskopen ist aufgrund des nur ca. 100 nm in die

25 Probe ragenden evaneszenten Feldes außerordentlich gut.

Es ist die Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Rastermikroskop anzugeben, mit dem sowohl die Vorteile einer evaneszenten Beleuchtung als auch die Vorteile der Rastermikroskopie nutzbar sind.

Die Aufgabe wird durch ein Rastermikroskop mit einer Lichtquelle, die eine auf

30 einem Objektträger angeordnete Probe evaneszent beleuchtet, mit einem Punktdetektor, der von einem Rasterpunkt der Probe ausgehendes

Detektionslicht empfängt, und mit einer im Strahlengang des Detektionslichtes angeordneten Strahlablenkeinrichtung zum Verschieben der Position des Rasterpunktes in der Probe, gelöst.

Die Erfindung hat den Vorteil, dass sowohl eine Abrasterung der Probe in zwei Dimensionen oder in drei Dimensionen, als auch ein stark gesteigertes Auflösungsvermögen in z-Richtung ermöglicht ist.

5 Das Abrastern der Probe in lateraler Richtung (xy-Richtung) wird mit Hilfe der im Strahlengang des Detektionslichts angeordneten Strahlablenkeinrichtung bewirkt. Zum Abrastern der Probe in axialer Richtung (z-Richtung) ist der Relativabstand von Probe und Objektiv verstellbar. Hierzu kann entweder die Probe auf einen höhenverstellbaren Tisch angeordnet sein oder ein in z-Richtung verstellbares Objektiv verwendet werden.

10 Das Beleuchtungslicht ist vorzugsweise durch das Objektiv des Rastermikroskops in das Deckglas der Probe einkoppelbar. In einer anderen Variante wird das Beleuchtungslicht durch den Kondensor des Rastermikroskops in den Objektträger eingekoppelt. In einer ganz anderen Variante erfolgt die Einkopplung weder durch das Objektiv noch durch den Kondensor sondern direkt, beispielsweise über ein Prisma, in den Objektträger.

15 Das Beleuchtungslicht verläuft vorzugsweise durch den Außenrandbereich der Objektivpupille, um zu gewährleisten, dass der kritische Winkel der Totalreflexion im Deckglas erreicht wird. Vorzugsweise ist das Beleuchtungslicht zu einem Beleuchtungslichtstrahlenbündel geformt, das vorzugsweise in der Ebene der Objektivpupille einen Fokus aufweist. Das Beleuchtungslichtstrahlenbündel kann während der Untersuchung einer Probe 20 ortsfest bleiben. In einer besonders bevorzugten Variante ist das Beleuchtungslichtstrahlenbündel mit Hilfe einer weiteren Strahlablenkeinrichtung kreisend durch den Außenbereich der Objektivpupille 25 beweglich. Hierdurch wird in besonders vorteilhafter Weise eine sehr homogene und gleichmäßige Beleuchtung erreicht.

20 Das Beleuchtungslicht verläuft vorzugsweise durch den Außenrandbereich der Objektivpupille, um zu gewährleisten, dass der kritische Winkel der Totalreflexion im Deckglas erreicht wird. Vorzugsweise ist das Beleuchtungslicht zu einem Beleuchtungslichtstrahlenbündel geformt, das vorzugsweise in der Ebene der Objektivpupille einen Fokus aufweist. Das Beleuchtungslichtstrahlenbündel kann während der Untersuchung einer Probe 25 ortsfest bleiben. In einer besonders bevorzugten Variante ist das Beleuchtungslichtstrahlenbündel mit Hilfe einer weiteren Strahlablenkeinrichtung kreisend durch den Außenbereich der Objektivpupille beweglich. Hierdurch wird in besonders vorteilhafter Weise eine sehr 30 homogene und gleichmäßige Beleuchtung erreicht.

Das Objektiv weist vorzugsweise eine numerische Apertur auf, die größer als 1,3 ist und besonders vorteilhafterweise zwischen 1,35 und 1,42 liegt.

In einer bevorzugten Ausgestaltungsform ist im Strahlengang des Beleuchtungslichtes vorzugsweise in der Ebene der Objektivpupille eine

5 farbselektive Segmentblende angeordnet. Die farbselektive Segmentblende weißt im Außenrandbereich andere optische Eigenschaften auf, als im Innenbereich. Vorzugsweise ist die farbselektive Segmentblende im Außenrandbereich für Licht der Wellenlänge des Beleuchtungslichts transparent, während sie im Innenbereich ausschließlich für Licht oberhalb der
10 Wellenlänge des Beleuchtungslichts transparent ist. Diese Ausgestaltungsvariante ist insbesondere für Fluoreszenzanwendungen, bei denen die Wellenlänge des Detektionslichts naturgemäß oberhalb der Wellenlänge des Beleuchtungslichts liegt, besonders zu bevorzugen.

15 In einer anderen Variante ist die farbselektive Segmentblende im Innenbereich ausschließlich für Licht unterhalb der Wellenlänge des Beleuchtungslichts transparent. Diese Variante ist insbesondere zur Mehrphotonenanregung der Probe geeignet. Hierbei ist das Beleuchtungslicht vorzugsweise gepulstes Infrarotlicht.

20 Mit Hilfe der farbselektiven Segmentblende wird vermieden, dass Beleuchtungslicht außerhalb des Außenrandbereiches durch das Objektiv auf die Probe gelangt und die Probe direkt beleuchtet.

25 In einer ganz besonders bevorzugten Ausgestaltungsvariante weist das Beleuchtungslicht mehrere Wellenlängen auf. In dieser Variante sind beispielsweise mehrere unterschiedliche Probenfarbstoffe gleichzeitig optisch anregbar.

Der Punkt detektor beinhaltet vorzugsweise in einer zur Fokalebene des Objektivs korrespondierenden Ebene eine Detektionslochblende. Die räumliche Lage des Rasterpunktes, von dem der Punkt detektor Detektionslicht empfangen kann, ist durch die Position der Detektionslochblende und durch
30 die Stellung der Strahlablenkeinrichtung festgelegt.

In einer bevorzugten Variante beinhaltet der Punktdetektor einen Multibanddetektor oder ein Spektrometer. Hierdurch ist es ermöglicht, spektrale Punktinformationen aus der Probe zu erhalten. Insbesondere in Kombination mit einer Mehrfarbbeleuchtung ist diese Ausführungsvariante von besonderem Vorteil.

Das erfindungsgemäße Rastermikroskop kann zusätzlich als konfokales Rastermikroskop ausgebildet sein, wobei gleichzeitig sowohl eine konfokale Untersuchung der Probe durch den Innenbereich der farbselektiven Segmentblende erfolgen kann, während gleichzeitig eine TIRF-Beleuchtung durch den Außenbereich der farbselektiven Segmentblende ermöglicht ist.

Zur Erzeugung des Fokus des Beleuchtungslichtstrahlenbündels in der Ebene der Objektivpupille ist im Strahlengang des Beleuchtungslichts eine Abbildungsoptik, vorzugsweise eine Bertrandlinse vorgesehen.

In einer ganz besonders bevorzugten Ausgestaltungsform umfasst der Lichtweg des Detektionslichts mehrere Detektionskanäle, wobei in jedem der Detektionskanäle ein Bandpassfilter vorgesehen sein kann.

In der Zeichnung ist der Erfindungsgegenstand schematisch dargestellt und wird anhand der Figuren nachfolgend beschrieben, wobei gleich wirkende Elemente mit denselben Bezugszeichen versehen sind. Dabei zeigen:

Fig. 1 ein erfindungsgemäßes Rastermikroskop,

Fig. 2 eine farbselektive Segmentblende,

Fig. 3 ein weiteres erfindungsgemäßes Rastermikroskop und

Fig. 4 ein weiteres erfindungsgemäßes Rastermikroskop.

Fig. 1 zeigt ein erfindungsgemäßes Rastermikroskop mit einer Lichtquelle 1, die als Argonionenlaser 3 ausgebildet ist. Die Lichtquelle 1 erzeugt ein Beleuchtungslichtstrahlenbündel 5, das von einem Strahlteiler 7 zu dem Objektiv 9 reflektiert wird. Das Beleuchtungslichtstrahlenbündel 5 verläuft durch den Außenrandbereich der Objektivpupille 11 (durch den Doppelpfeil 24 angedeutet) und wird in das Deckglas 13 der Probe 15 zur evaneszenten Beleuchtung eingekoppelt. Im Strahlengang des

Beleuchtungslichtstrahlenbündels 5 befindet sich eine als Bertrandlinse 17 ausgebildete Abbildungsoptik 19, die in der Ebene der Objektivpupille 11 einen Fokus erzeugt. Außerdem befindet sich im Strahlengang des Beleuchtungslichtstrahlenbündels 5 eine weitere Strahlablenkeinrichtung 21, 5 die einen nicht gezeigten kardanisch aufgehängten Scanspiegel beinhaltet. Mit Hilfe der weiteren Strahlablenkeinrichtung wird der Fokus des Beleuchtungslichtstrahlenbündels kontinuierlich kreisend durch den Außenrandbereich der Objektivpupille 11 bewegt, wodurch eine besonders homogene evaneszente Beleuchtung erreicht wird. In der Ebene der 10 Objektivpupille 11 ist die in Fig. 2 gezeigte farbselektive Segmentblende 23 angeordnet. Die farbselektive Segmentblende 23 weist einen Außenrandbereich 25 auf, der für das Beleuchtungslicht transparent ist. Außerdem weist die farbselektive Segmentblende 23 einen Innenbereich 27 auf, der für Licht oberhalb der Wellenlänge des Beleuchtungslichts transparent 15 ist. Das von der Probe ausgehende Detektionslicht 51 gelangt durch das Objektiv und den Innenbereich der farbselektiven Segmentblende zum Strahltreiber 7, passiert diesen und gelangt über die Strahlablenkeinrichtung 29, die einen kardanisch aufgehängten Scanspiegel 31 beinhaltet, zum Punkt detektor 33. Der Punkt detektor 33 beinhaltet eine Detektionslochblende 20 35, deren räumliche Lage zusammen mit der Stellung des kardanisch aufgehängten Scanspiegels 31 die Position des Rasterpunktes in der Probe bestimmt, von dem der Punkt detektor 33 Detektionslicht 51 empfängt. Der Punkt detektor 33 beinhaltet einen Multiband detektor 36, der simultan Detektionslicht 51 in mehreren einstellbaren Wellenlängenbändern empfangen 25 kann. Das Beleuchtungslichtstrahlenbündel des Argonionenlasers 3 beinhaltet Beleuchtungslicht mehrerer Wellenlängen, wodurch eine Mehrfarbanregung der Probe ermöglicht ist.

Fig. 3 zeigt ein weiteres erfindungsgemäßes Rastermikroskop, bei dem simultan zur TIRF-Untersuchung einer Probe eine konfokale Untersuchung 30 einer Probe ermöglicht ist. Dieses Rastermikroskop beinhaltet eine weitere Lichtquelle 37, die als gepulster Titan-Saphirlaser 39 ausgebildet ist und die ein weiteres Beleuchtungslichtstrahlenbündel 41 emittiert. Das weitere

Beleuchtungslichtstrahlenbündel 41 gelangt durch einen zweiten Strahlteiler 43 und über die Strahlablenkeinrichtung 29, sowie durch den Strahlteiler 7 und einen dritter Strahlteiler 45 zum Objektiv 9 und beleuchtet durch den Innenbereich 27 der Segmentblende 23 durch die Probe 15 direkt. In der 5 Probe 15 wird unabhängig von der TIRF-Beleuchtung mit dem Beleuchtungslichtstrahlenbündel 5 durch das weitere Beleuchtungslichtstrahlenbündel 41 eine Zweiphotonenanregung der Probe bewirkt. Das durch die Zweiphotonenanregung der Probe entstehende weitere Detektionslicht 53 wird mit Hilfe eines Non-Descan-Detektors 47, der als CCD- 10 Element 49 ausgebildet ist, detektiert. Dieses weitere Detektionslicht 53 gelangt über den Innenbereich des Objektivs, durch Reflexion am dritten Strahlteiler 45 zu dem Non-Descan-Detektor 47. Bei diesem Rastermikroskop ist in der Objektivpupille eine andere farbselektive Segmentblende eingesetzt, die im Außenrandbereich für das Beleuchtungslichtstrahlenbündel 5 der 15 Lichtquelle 1 transparent ist und die im Innenbereich für dieses Licht reflektierend ausgebildet ist. Hierdurch ist gewährleistet, dass kein Beleuchtungslicht direkt auf die Probe eingestrahlt wird. Die Strahlteiler 7, 45 und 43 sind derart ausgebildet, dass weder das Licht des Beleuchtungslichtstrahlenbündels 5 als auch des Titan-Saphirlasers 39 zu 20 dem Punkt detektor 33 oder zu dem Non-Descan-Detektor 47 gelangt.

In Fig. 4 ist eine weitere denkbare Variante des erfindungsgemäßen Rastermikroskops dargestellt. In diesem Fall besteht die Lichtquelle 1 aus einem Titan-Saphirlaser 55, der ein Beleuchtungslichtstrahlenbündel 5 emittiert, das als TIRF-Beleuchtung durch den Außenrandbereich 25 einer 25 farbselektiven Segmentblende 23 geführt wird. Die evaneszente Beleuchtung induziert in der Probe 15 Mehrphotonenanregung. Das daraus entstehende Fluoreszenzlicht gelangt durch die gesamte Segmentblende 23 über den dritten Strahlteiler 45 zum Non-Descan-Detektor 47, der als CCD-Element 49 ausgeführt ist. Direkt im Anschluss daran wird ein dreidimensionales Bild der 30 Probe durch konfokale Beleuchtung mit einer Lichtquelle 37, die aus einem Argonionenlaser 57 besteht, und Detektion mit einem Punkt detektor 33, der als Multiband detektor 36 ausgebildet ist, aufgenommen.

Die Erfindung wurde in Bezug auf eine besondere Ausführungsform beschrieben. Es ist jedoch selbstverständlich, dass Änderungen und Abwandlungen durchgeführt werden können, ohne dabei den Schutzbereich der nachstehenden Ansprüche zu verlassen.

Bezugszeichenliste:

1	Lichtquelle
3	Argonionenlaser
5	5 Beleuchtungslichtstrahlenbündel
	7 Strahlteiler
	9 Objektiv
	11 Objektivpupille
	13 Deckglas
10	15 Probe
	17 Bertrandlinse
	19 Abbildungsoptik
	21 Strahlablenkeinrichtung
	23 Segmentblende
15	24 Doppelpfeil
	25 Außenrandbereich
	27 Innenbereich
	29 Strahlablenkeinrichtung
	31 Scanspiegel
20	33 Punktdetektor
	35 Detektionslochblende
	36 Multibanddetektor
	37 Lichtquelle
	39 Titan-Saphirlaser
25	41 Beleuchtungslichtstrahlenbündel
	43 zweiter Strahlteiler
	45 dritter Strahlteiler
	47 Non-Descan-Detektor
	49 CCD-Element
30	51 Detektionslicht
	53 Detektionslicht
	55 Titan-Saphir-Laser

Patentansprüche

1. Rastermikroskop mit einer Lichtquelle, die eine auf einem Objektträger angeordnete Probe evaneszent beleuchtet, mit einem Punktdetektor, der von einem Rasterpunkt der Probe ausgehendes Detektionslicht empfängt, und mit einer im Strahlengang des Detektionslichtes angeordneten Strahlablenkeinrichtung zum Verschieben der Position des Rasterpunktes in der Probe.
- 5 2. Rastermikroskop nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Beleuchtungslicht in den Objektträger oder in das Deckglas der Probe einkoppelbar ist.
- 10 3. Rastermikroskop nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Rastermikroskop einen Kondensor aufweist und das Beleuchtungslicht durch den Kondensor in den Objektträger einkoppelbar ist.
- 15 4. Rastermikroskop nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Rastermikroskop ein Objektiv aufweist und das Beleuchtungslicht durch das Objektiv in das Deckglas einkoppelbar ist.
- 5 5. Rastermikroskop nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass das Objektiv eine Objektivpupille aufweist und dass das Beleuchtungslicht durch den Außen-Randbereich der Objektivpupille verläuft.
- 20 6. Rastermikroskop nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass das Beleuchtungslicht in einem Beleuchtungslichtstrahlenbündel verläuft.
7. Rastermikroskop nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass der Beleuchtungslichtstrahlenbündel in der Ebene der Objektivpupille einen Fokus aufweist.
- 25 8. Rastermikroskop nach einem der Ansprüche 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, dass im Strahlengang des Beleuchtungslichtes eine weitere Strahlablenkeinrichtung vorgesehen ist, mit der die räumliche Lage des Beleuchtungslichtstrahlenbündels veränderbar ist.
9. Rastermikroskop nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass 30 die weitere Strahlablenkeinrichtung das Beleuchtungslichtstrahlenbündel

kreisend durch den Außen-Randbereich der Objektivpupille lenkt.

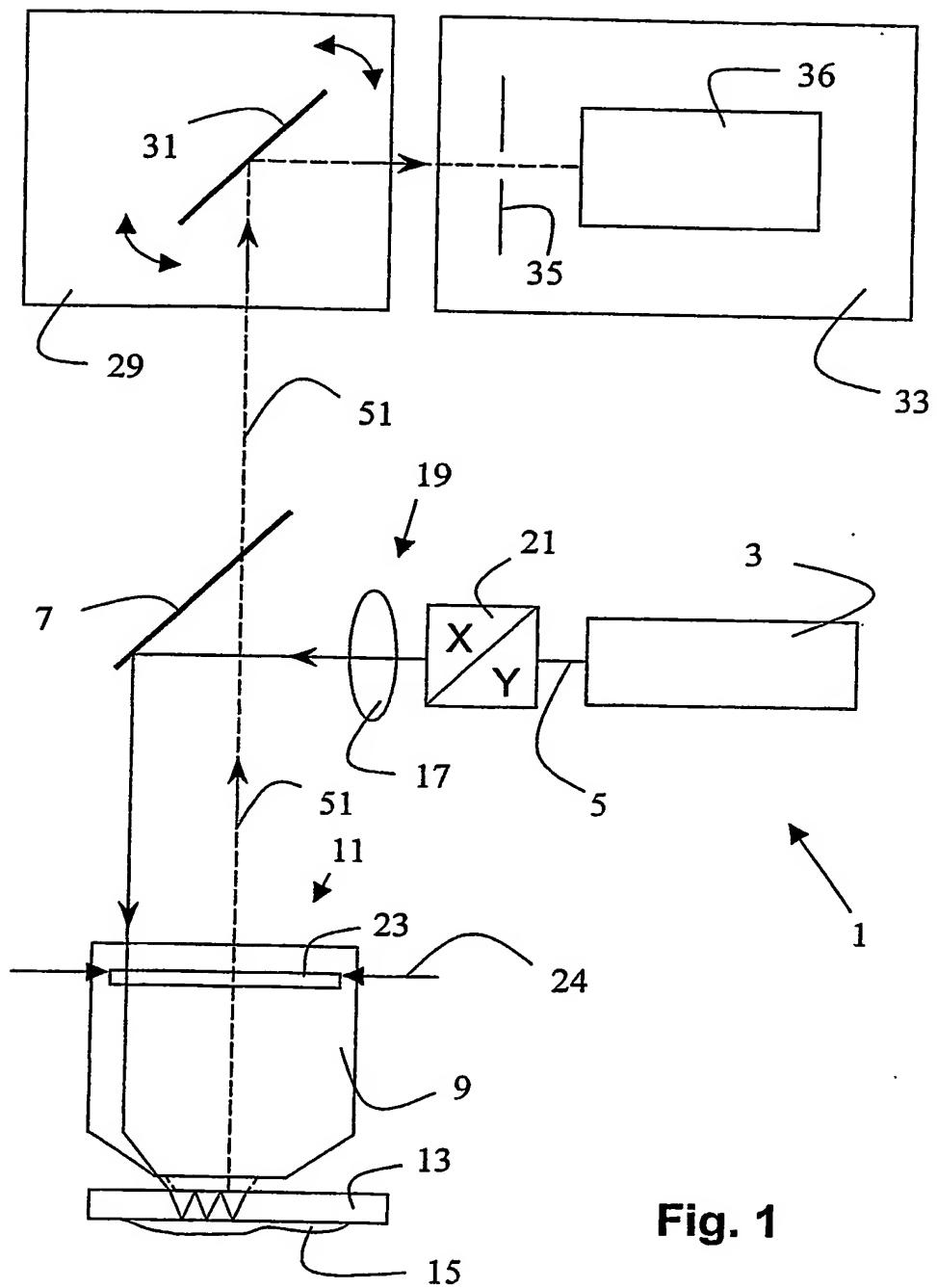
10. Rastermikroskop nach einem der Ansprüche 4 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass das Objektiv eine numerische Apertur größer 1,3, vorzugsweise zwischen 1,35 und 1,42, aufweist.
- 5 11. Rastermikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass im Strahlengang des Beleuchtungslichtes, vorzugsweise in der Ebene der Objektivpupille, eine farbselektive Segmentblende angeordnet ist.
12. Rastermikroskop nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet,- 10 dass die farbselektive Segmentblende im Außen-Randbereich für Licht der Wellenlänge des Beleuchtungslichts transparent ist.
- 13. Rastermikroskop nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass die farbselektive Segmentblende im Innenbereich ausschließlich für Licht oberhalb Wellenlänge des Beleuchtungslichts transparent ist.
- 15 14. Rastermikroskop nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass die farbselektive Segmentblende im Innenbereich ausschließlich für Licht unterhalb Wellenlänge des Beleuchtungslichts transparent ist.
- 15. Rastermikroskop nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass das Beleuchtungslicht, vorzugsweise gepulstes Infrarotlicht ist.
- 20 16. Rastermikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass das Beleuchtungslicht mehrere Wellenlängen aufweist.
- 17. Rastermikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass der Punkt detektor einen Multibanddetektor oder ein Spektrometer beinhaltet.
- 25 18. Rastermikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass der Punkt detektor eine Detektionslochblende beinhaltet.
- 19. Rastermikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass das Rastermikroskop als konfokales Rastermikroskop ausgebildet ist.

Zusammenfassung

Ein Rastermikroskop beinhaltet eine Lichtquelle, die eine auf einem Objekträger angeordnete Probe evaneszent beleuchtet. Ein Punkt detektor empfängt von einem Rasterpunkt der Probe ausgehendes Detektionslicht,

5 wobei im Strahlengang des Detektionslichtes eine Strahlablenkeinrichtung angeordnet ist mit der die Position des Rasterpunktes in der Probe verschiebbar ist.

10 Fig. 1



23



25

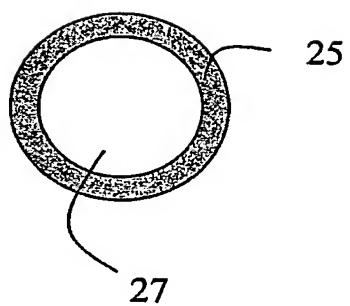


Fig. 2

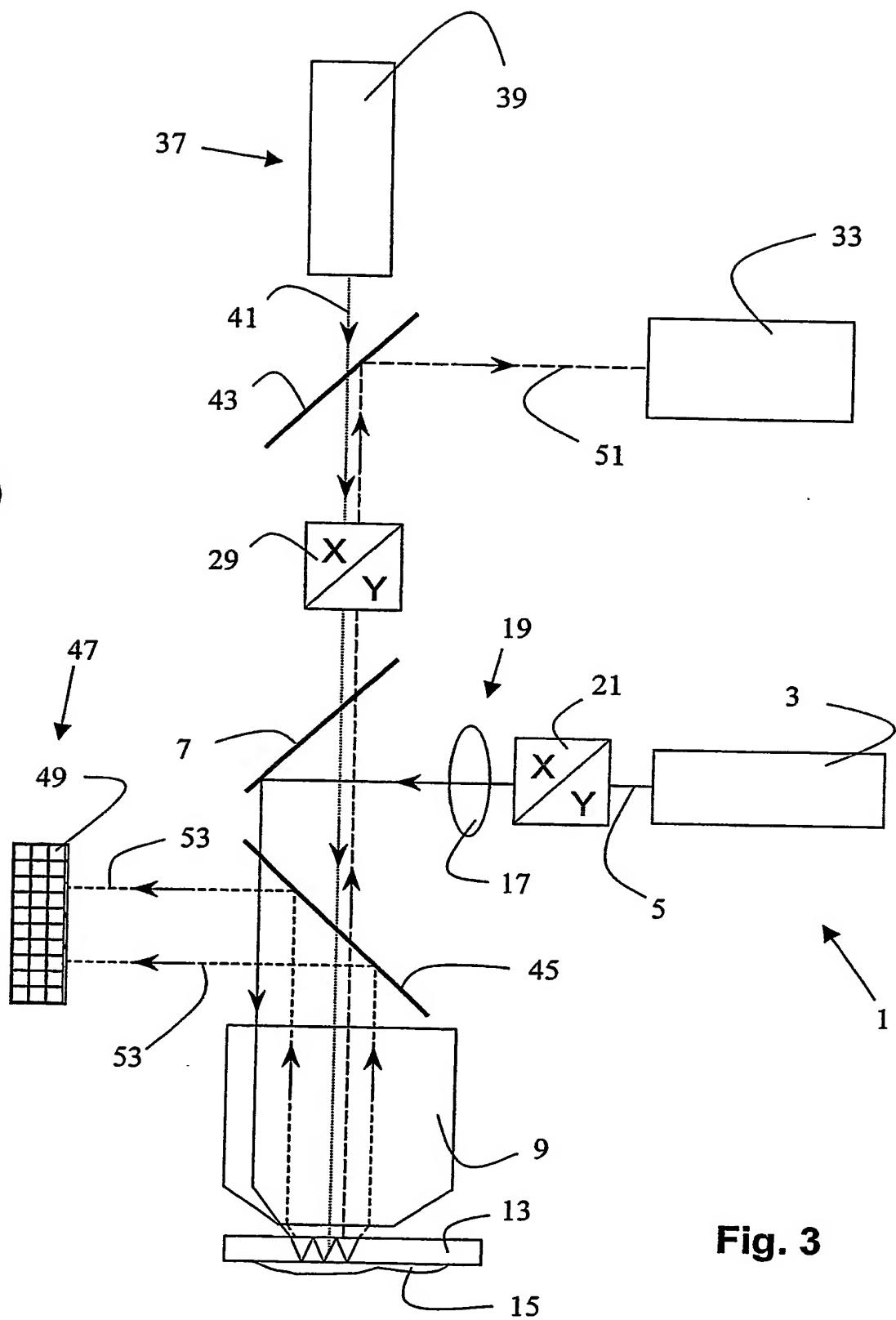


Fig. 3

